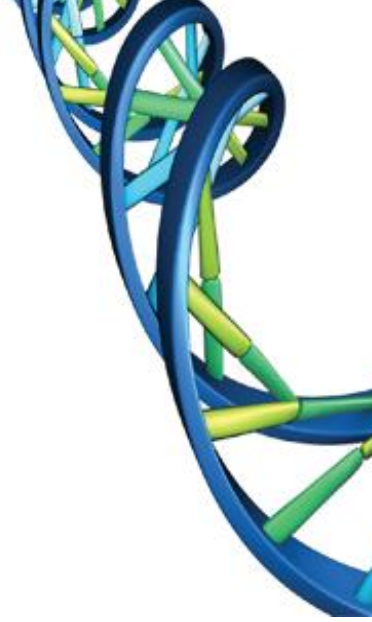


Consignes d'Utilisation du SURVEYOR® Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD

pour les Systèmes DHPLC

CE IVD

Veuillez lire attentivement ces consignes d'utilisation avant d'utiliser ce produit.

Gardez-les dans un endroit sûr pour pouvoir vous y reporter à l'avenir.

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Cette page est intentionnellement laissée vierge.

Table des matières

1 Fabricant **3**
2 SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD **3**
2.1 Utilisation prévue 3
2.2 Mode d'emploi 3
3 Principes régissant le test de détection de mutation SURVEYOR Scan *KRAS* **4**
3.1 *KRAS* et *NRAS* 4
3.2 Analyse des échantillons patients en utilisant les kits SURVEYOR Scan 4
3.3 SURVEYOR Nuclease 5
4 Traçabilité des contrôles des kits **6**
5 Composants **6**
5.1 Nombre d'échantillons qui peut être testé avec un kit 6
5.2 Séquençage d'ADN 7
6 Équipement et réactifs supplémentaires nécessaires **7**
7 Préparation des réactifs **7**
8 Conservation et durée de validité **7**
9 Mises en garde et précautions **8**
10 Prélèvement, manipulation et conservation de l'échantillon primaire **8**
11 Procédure de test **9**
11.1 Détection de mutation somatique avec les kits SURVEYOR Scan - Présentation générale 9
12 Consignes étape par étape **10**
12.1 Installation/Etalonnage INITIAL de la DHPLC 10
12.2 Considérations avant l'analyse d'échantillons *KRAS* 10
12.3 Considérations relatives aux matrices 10
12.4 Considérations relatives aux flux de travail 11
12.5 Protocole d'amplification 13
12.7 Programme du thermocycleur pour le protocole d'amplification 15
12.8 Contrôle qualité des produits de PCR 15
12.9 Digestion SURVEYOR Nuclease 16
13 Procédures de contrôle **17**
13.1 Contrôle qualité du SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD 17
13.2 Utilisation des ADN plasmidiques de contrôle 17
14 Interprétation des résultats **18**
14.1 Analyse de *KRAS* Exon 2 avec SURVEYOR Nuclease 18
14.2 Lecture des données d'analyse SURVEYOR Scan 18
14.3 Exemples de résultats 19
15 Caractéristiques et performance **20**
15.1 Seuil de détection des mutations avec les kits SURVEYOR Scan 20
15.2 Confirmation par séquençage 20
15.3 Limites du Kit 20
Appendice A **22**
A.1 Schéma de configuration des plaques pour les kits SURVEYOR Scan 22
A.2 Empreintes de l'ADN de contrôle 22
A.3 Exigences du système HPLC en phase dénaturante (DHPLC) 22
A.4 Configuration du laboratoire pour les tests PCR 23
A.5 Références Documentaires 25
Appendice B **26**
Guide de Résolution des Problèmes 26
Informations relatives aux commandes **32**
Coordonnées **32**
Responsabilité de traduction **32**
Licences, marques & droit d'auteur **33**

1 Fabricant

Fabricant		Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, USA Tél. 1-402-452-5400
Représentant CE		Transgenomic Limited 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, UK Tél. +44-141-892-8800

2 SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD

2.1 Utilisation prévue

À usage professionnel uniquement. Le Transgenomic SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD est un test de diagnostic in vitro qui détecte les mutations somatiques de l'Exon 2 du gène *KRAS*. Ces mutations sont indiquées par des pics de clivage SURVEYOR Nuclease et comprennent les mutations connues pour leur signifiance clinique potentielle. Le kit est conçu pour être utilisé dans un laboratoire de diagnostic clinique par du personnel adéquatement formé aux analyse d'ADN extrait de tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine.

Ce kit, référence catalogue 710104, est fourni dans une boîte unique contenant les composants ci-dessous. Les consignes d'utilisation peuvent être téléchargées à partir de la page http://world.transgenomic.com/files/literature/482404-FR.pdf.

2.2 Mode d'emploi

Les cliniciens peuvent utiliser le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD avec les Systèmes DHPLC pour s'aider à décider si les patients atteints d'un cancer colorectal sont susceptibles ou non de répondre à un traitement anti-EGFR (récepteur de facteur de croissance épidermique) tel que le panitumumab.

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD doit être utilisé avec le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 3 & 4 CE IVD et le SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 CE IVD.

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD **ne doit pas** être utilisé dans le diagnostic du cancer colorectal ou d'un autre cancer.

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD est un test qui détecte la présence de mutation somatique potentielle dans l'exon 2 du gène *KRAS* mais sans pour autant confirmer l'identité de la séquence de mutation. **Pour confirmer précisément la mutation détectée, des analyses supplémentaires, telles que le séquençage de l'ADN, seront nécessaires.**

Bien que les résultats de cette analyse avec ce kit indiquent le statut mutationnel du patient, d'autres facteurs cliniques doivent être pris en compte, notamment les mutations des Exons 3 & 4 de *KRAS* et des Exons 2, 3 & 4 de *NRAS*. Les résultats du SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD **ne doivent pas être utilisés comme méthode unique pour prendre des décisions concernant le traitement des patients atteints d'un cancer colorectal.**

Il est important de noter que l'utilisation de la DHPLC pour identifier les échantillons positifs de mutation du gène *KRAS* avec ce kit doit uniquement servir d'indication et que **toutes les mutations doivent être confirmées par des analyses supplémentaires, telles que le séquençage de l'ADN.**

3 Principes régissant le test de détection de mutation SURVEYOR Scan *KRAS*

3.1 *KRAS* et *NRAS*

Des agents thérapeutiques ciblant le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) ont prouvé leur efficacité contre le cancer colorectal. Les recherches ont indiqué qu'environ 40% des tumeurs colorectales présentent des mutations somatiques du gène *KRAS* et les études cliniques ont prouvé que les mutations de l'exon 2 (codons 12 et 13) de *KRAS* sont prédictifs d'une absence de réponse aux traitements anti-EGFR. Des études exploratoires récentes ont démontré que la population de patients peut-être encore plus précisément définie puisque les patients dont les tumeurs mCRC présentent une mutation supplémentaire des exons 3 et 4 de *KRAS et des* exons 2, 3 et 4 de *NRAS* ne semblent pas non plus avoir tendance à répondre au traitement contenant des anti-EGFR[1-7]. Ce kit est conçu pour l'analyse diagnostique de mutations somatiques de l'exon 2 de *KRAS*.

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD est un test visant à détecter toutes les altérations de séquence et petites insertions/délétions de l'exon 2 du gène *KRAS*. Les mutations des codons 12 et 13 de *KRAS* ont été associées avec un manque d'efficacité du panitumumab. Des contrôles Positive Control sont fournis dans ce kit pour les mutations des codons 12 et 13.

Ce kit s'appuie sur la technologie propriétaire de Transgenomic, SURVEYOR Nuclease, qui, lorsqu'elle est associée à la DHPLC, permet une détection simple et sensible de mutations potentielles. Il peut détecter un mélange mutant de 2-5% dans un bruit de fond d'ADN non mutant. Des études de validation ont démontré l'existence d'une correspondance extrêmement élevée avec le séquençage parmi des échantillons bien caractérisés de cancer colorectal. L'utilisation du SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD diminuera à la fois la charge de séquençage de l'utilisateur et aidera ce séquençage lorsqu'un logiciel de séquençage automatique ne parvient pas à déterminer la présence de faibles niveaux de mutation.

En raison de la haute sensibilité de ce test par rapport au séquençage Sanger, il est conseillé d'optimiser la configuration du laboratoire pour faire en sorte d'éviter toute contamination croisée des contrôles ou des échantillons. Pour un exemple de configuration optimale du laboratoire, consulter ***Appendice A.4 Configuration du laboratoire pour les tests PCR***.

3.2 Analyse des échantillons patients en utilisant les kits SURVEYOR Scan

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD ne devra être utilisé que dans le contexte de l'un des flux de travail indiqués ci-dessous.

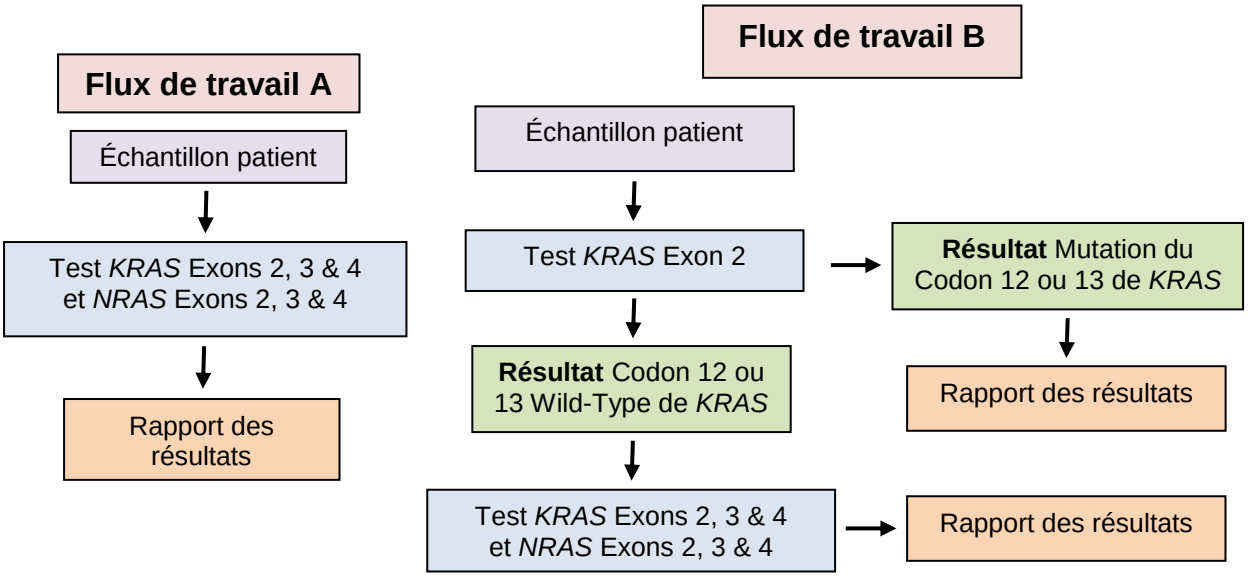

Flux de travail A
Échantillon patient
Test *KRAS* Exons 2, 3 & 4 et *NRAS* Exons 2, 3 & 4
Rapport des résultats
Flux de travail B
Échantillon patient
Test *KRAS* Exon 2
Résultat Mutation du Codon 12 ou 13 de *KRAS*
Rapport des résultats
Résultat Codon 12 ou 13 Wild-Type de *KRAS*
Test *KRAS* Exons 2, 3 & 4 et *NRAS* Exons 2, 3 & 4
Rapport des résultats

Figure 1 Flux de travail du kit de détection de la mutation du gène *KRAS* et du gène *NRAS* SURVEYOR Scan

Pour obtenir des suggestions sur la méthode de préparation des plaques de 96 puits de tous les Exons *2-4 KRAS* et *NRAS*, voir l'***Appendice A.1 Schéma de configuration des plaques pour les kits SURVEYOR Scan.***

3.3 SURVEYOR Nuclease

SURVEYOR Nuclease de Transgenomic est une endonucléase de plante spécifique des mésappariements de l'ADN extraite à partir de plantes et capable de détecter les polymorphismes et mutations connus ou inconnus d'ADN hétéroduplexe[8]. L'enzyme clive l'ADN très spécifiquement au niveau des sites de mésappariement liés à la présence de substitution de bases ou d'autres distorsions. Cette endonucléase d'ADN coupe les deux brins d'un hétéroduplexe d'ADN du côté 3' du site de mésappariement. Les mésappariements liés à l'insertion/délétion et tous les mésappariements de substitution de base sont reconnus, mais l'efficacité du clivage varie en fonction de la séquence du mésappariement.

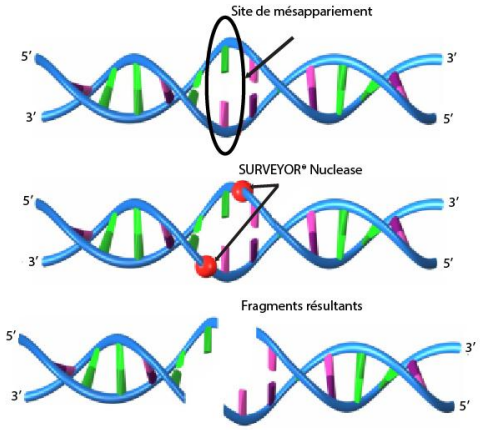


Figure 2. Mode d'action de SURVEYOR Nuclease. L'endonucléase reconnaît un mésappariement et clive du côté 3' de chaque base du mésappariement. Cela clive l'ADN double brin et produit une extrémité 3' sortante d'une seule base.

SURVEYOR Nuclease a été utilisée dans un large éventail de contextes pour détecter avec précision une variété de mutations et de polymorphismes de gènes. En particulier, SURVEYOR Nuclease a été utilisé pour vérifier la présence de mutations connues dans un certain nombre de gènes associés avec le cancer du rein, le cancer des poumons, le cancer de la tête et du cou, la leucémie, le cancer de l'endomètre et dans les évaluations prédictives de l'efficacité de la radiothérapie.[9,10,11].

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD a été conçu pour cliver les mésappariements de l'Exon 2 du gène *KRAS* afin de les révéler par analyse consécutive avec DHPLC.

Remarque: Si un échantillon est 100% d'ADN mutant, aucun hétéroduplexe ne peut être formé et l'échantillon apparaît comme étant "Wild-Type". Toutefois, les échantillons de biopsie tumorale contiendront des cellules Wild-Type en raison de l'hétérogénéité de la tumeur et/ou de la contamination de tissus normaux; noter que ce kit détecte 5% Wild-Type avec des traces identiques à 5% d'ADN mutant.

Remarque: Seul le DNA Polymerase fourni avec ce kit doit être utilisée pour réaliser ce test.

Remarque: Veuillez respecter les instructions spécifiques de votre manuel d'utilisation du Système DHPLC.

Pour bien utiliser ce kit, nous vous conseillons vivement de lire entièrement et attentivement ce manuel et de suivre à la lettre les instructions et conseils y figurant. Les novices devront effectuer les expériences de contrôle indiquées au chapitre Utilisation des ADN plasmidiques de contrôle.

Si vous avez des questions ou avez besoin d'assistance, veuillez appeler le (888) 233-9283 (Amérique du Nord uniquement), +1 (402) 452-5400 ou +44 (0) 141 892 8800 (Europe) en demandant à parler à l'équipe "Assistance technique *KRAS*". Vous pouvez également nous envoyer un e-mail à l'adresse:

SURVEYORscan@Transgenomic.com

4 Traçabilité des contrôles des kits

Les contrôles fournis avec de kit sont des clones plasmidiques de séquences *KRAS* Exon 2. Tous les clones ont été séquencés afin de vérifier la fidélité de la séquence en la comparant à la NCBI Reference Sequence: NG_007524.1.

Les contrôles ont une “empreinte” génétique. Voir ***Appendice A.2 Empreintes de l'ADN de contrôle***; ces variations de la séquence *KRAS* Wild-Type dans une région où des mutations ne sont pas prévues peuvent être utilisées pour résoudre les contaminations éventuelles de l'échantillon par les Contrôles Positive Control. Voir ***Appendice B - Guide de Résolution des Problèmes , Problème 8***, pour y trouver un exemple d'une trace de contamination de ce genre de SURVEYOR Scan.

Le ***“KRAS* Control Wild-Type”** a été élaboré par synthèse et clonage de l'Exon 2 *KRAS* en utilisant la séquence de référence NCBI ci-dessus.

Le “***KRAS* Positive Control Exon 2**” a été élaboré par synthèse de l'exon 2 *KRAS* en utilisant la séquence de référence ci-dessus contenant la mutation G12D. Le séquençage de l'ADN a confirmé que le seul changement de la séquence est situé au codon 12 avec une altération de G12D, GGT>GAT. Ce clone est ensuite mélangé avec l'ADN *KRAS* Control Wild-Type afin de créer un mélange hétérozygote.

5 Composants

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD se compose de (1) une **Boîte de composants de digestion SURVEYOR** avec 10 tubes de réactif sans emplacements vides et (2) un **Porte-tubes de contrôles et composants de PCR contenant** 11 tubes de réactif et 9 emplacements vides.

Référence catalogue	Composant	Couleur des bouchons de tubes	Kit comprenant assez de produit pour 100 réactions
Boîte de composants de digestion SURVEYOR			
710160	SURVEYOR Nuclease W	Violet	2 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	Noir	105 µL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	Rose	105 µL
708027	0.15 M $MgCl_2$ Solution	Marron	105 µL
708030	SURVEYOR Stop Solution	Rouge	250 µL
710153F	Universal Sequencing Primer 1 (10 µM)	Orange	2 x 125 µL
710153R	Universal Sequencing Primer 2 (10 µM)	Orange	2 x 125 µL
Boîte de contrôles et composants de PCR			
703310	DNA Polymerase	Rouge	100 µL
703315	DNA Polymerase 10X PCR Buffer	Transparent	1 mL
703065	dNTPs (10 mM)	Transparent	500 µL
710155F	*KRAS* Primer Exon 2 Forward (10 µM)	Bleu	3 x 90 µL
710155R	*KRAS* Primer Exon 2 Reverse (10 µM)	Bleu	3 x 90 µL
710131	*KRAS* Control Wild-Type	Jaune	120 µL
710135	*KRAS* Positive Control Exon 2	Vert	40 µL
482404	Mode d'emploi	À télécharger sur le site Internet* http://world.transgenomic.com/files/literature/482404-FR.pdf	

5.1 Nombre d'échantillons qui peut être testé avec un kit

Le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD est conçu pour permettre d’effectuer 100 réactions. Le nombre total d'échantillons pouvant être testé avec le kit dépend nombre moyen d'échantillons testés simultanément par lot car un jeu de témoins de référence (Contrôle Wild-Type, Positive Control et Contrôle sans matrice) doit être inclus dans chaque plaque d’analyse. Le tableau ci-dessous indique le nombre d'échantillons pouvant être analysés avec le kit *KRAS* en

fonction du nombre moyen d'échantillons par série. Les calculs ont été réalisés en gardant à l'esprit (a) les 3 contrôles (Wild-Type, Positive Control, Contrôle sans matrice) nécessaires pour chaque série et (b) la limite de 100 réactions par kit.

Remarque : Si plusieurs plaques sont testées, un jeu des 3 contrôles cités ci-dessus doit être testé sur chaque plaque. Par conséquent, deux plaques nécessitent un total de 6 réactions de contrôle, 3 plaques nécessitent 9 réactions de contrôle, etc.

Lorsque le nombre d'échantillons par lot augmente, le nombre d'échantillons pouvant être analysés dans un seul kit augmente également, ce qui fait baisser le coût moyen de réactif. Le tableau ci-dessous sert de guide par rapport au nombre d'échantillons pouvant être testés avec un seul kit.

5.2 Séquençage d'ADN

Les amorces Universal Sequencing Primers (PN 710153F et 710153R) sont fournies pour servir au séquençage de l'ADN de tous les échantillons testés. Les amplicons PCR créés avant la digestion SURVEYOR Nuclease doivent être utilisés pour le séquençage.

6 Équipement et réactifs supplémentaires nécessaires

Les équipements et réactifs supplémentaires nécessaires à l'utilisation du SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD avec DHPLC comprennent:

Colonne pour Système DHPLC, tampons, standard de taille d'ADN- voir l'***Appendice A.3.1 Spécifications du DHPLC pour les applications SURVEYOR Scan*** pour obtenir les caractéristiques correspondant au système DHPLC adéquat à utiliser avec ce kit

Eau de qualité biologie moléculaire

Tubes de 0,2 mL-PCR, bandelettes ou plaque de 96 puits

Micro-pipeteurs

Embouts de pipette

Bain de glace

Vortexer

Microcentrifuge

Thermocycleur

Gel d'agarose et équipement pour électrophorèse en gel d'agarose

Eau de javel 10% ou produit nettoyant similaire

7 Préparation des réactifs

Tous les réactifs fournis avec ce kit sont prêts à l'emploi. Certains composants devront être décongelés, vortexés ou agités dans la centrifugeuse avant leur utilisation; reportez-vous aux détails sur la ***Procédure de Test*** figurant ci-dessous. Les réactifs doivent être mélangés afin de produire un Mélange Maître et des mélanges de réaction; tous les détails sont précisés dans la ***Procédure de Test*** figurant ci-dessous.

8 Conservation et durée de validité

Le kit doit être conservé entre -18 ºC et -25 °C à température constante dans un congélateur jusqu'à son utilisation. Notez la date d'expiration de chaque kit reçu. Ne pas utiliser le kit après la date d'expiration.

Le mélange SURVEYOR Nuclease préparé à l'étape 7 de la ***Digestion avec SURVEYOR Nuclease*** doit être utilisé ***immédiatement*** car SURVEYOR Nuclease W se désactive au fil du temps en présence des autres composants du mélange de réaction SURVEYOR Nuclease.

9 Mises en garde et précautions

Aucun des kits de réactifs ne présente de danger pour la santé dans les quantités fournies. Le document Transgenomic Réf. MSD-710104 peut être téléchargé à partir de

http://world.transgenomic.com/files/literature/710104-FR.pdf

Ce kit ne contient aucune substance d'origine humaine ou animale qui présente un risque d'infection.

Ce kit doit être uniquement utilisé par les personnes ayant été formées aux techniques de laboratoires appropriées. Lorsque vous travaillez avec les composants de ce kit, portez toujours une blouse de laboratoire appropriée, des gants jetables ainsi que des lunettes de protection. Après utilisation, les composants du kit doivent être éliminés comme déchets cliniques conformément aux réglementations et règlements locaux.

Les aliquots de réactifs pipetés à partir des tubes de ce kit ne doivent être utilisés qu'une seule fois. Les composants de ce kit ont été validés comme restant stables pendant 25 cycles de congélation/décongélation. Ne pas utiliser ce kit au-delà de ce nombre de cycles de congélation/décongélation.

10 Prélèvement, manipulation et conservation de l'échantillon primaire

Le système SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD for DHPLC a été validé pour être utilisé avec de l'ADN extrait d'échantillons de tumeurs colorectales cancéreuses enrobés de paraffine et fixés au formol (FFPE). Pour assurer une extraction optimale de l'ADN, le tissu doit être fixé au formol pendant 14–24 heures avant d'être enrobé de paraffine.

Les biopsies de tumeurs sont des mélanges hétérogènes de cellules tumorales et non tumorales. La tumeur elle-même consiste en un mélange hétérogène de cellules tumorales **avec et** sans mutations. Parce que ces mutations somatiques peuvent ne pas être réparties de manière égale dans toute la tumeur, l'analyse des mutations des différentes sections de la même tumeur en résultant pourra s'avérer différente. Pour augmenter la probabilité de détection d'une mutation, l'ADN issu de la région tumorale du tissu doit être isolé en grattant uniquement la région tumorale de la surface vitrée à l'aide d'un scalpel stérile pour chaque nouvelle lame.

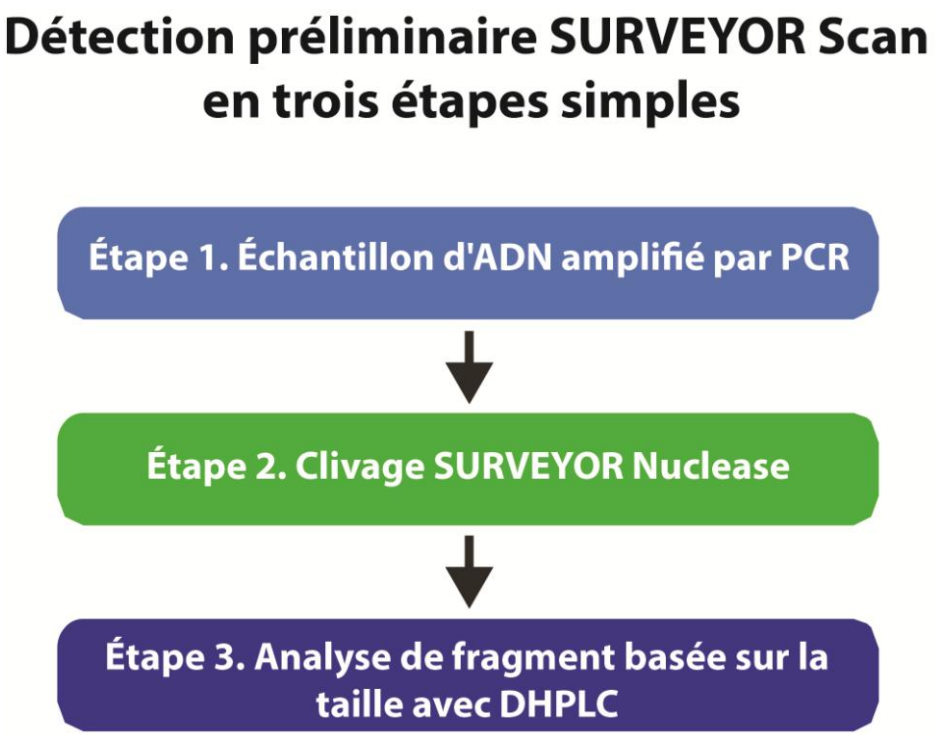
Pour assurer une utilisation réussie de ce kit, l'ADN extrait devra répondre aux critères figurant dans les ***Considérations relatives aux matrices***

REMARQUE: Les échantillons d'ADN extrait dont l'utilisation n'est pas prévue pour une analyse immédiate au moyen de ce kit doivent être stockés congelés entre -20 ºC et -80 ºC.

11 Procédure de test

11.1 Détection de mutation somatique avec les kits SURVEYOR Scan - Présentation générale

La détection et la confirmation de mutation avec SURVEYOR Nuclease impliquent les 3 étapes suivantes:


Détection préliminaire SURVEYOR Scan
en trois étapes simples
Étape 1. Échantillon d'ADN amplifié par PCR
Étape 2. Clivage SURVEYOR Nuclease
Étape 3. Analyse de fragment basée sur la taille avec DHPLC

Étape 1 - Préparez les amplicons PCR amplicons à partir de l'ADN mutant (test) et normal (référence), en poursuivant le dernier cycle d'amplification de PCR par une dénaturation pour fondre l'ensembles des les doubles brins puis les refroidir lentement afin d'assurer la formation optimale d'hétéroduplexes et d'homoduplexes (les hétéroduplexes se forment lorsqu'un brin d'une séquence de Wild-Type s'hybride avec un brin d'une séquence mutante).

Étape 2 - Traiter une partie du mélange hybridé hétéroduplexe/homoduplexe avec SURVEYOR Nuclease. SURVEYOR Nuclease sectionnera les deux brins d'ADN hétéroduplexe pour produire des fragments d'ADN. L'ADN référence Control Wild-Type, traité de manière similaire, sert de contrôle de fond.

Étape 3 - Analyse des fragments d'ADN avec un système DHPLC. La formation de nouveaux produits de clivage dus à la présence d'un ou plusieurs mésappariements est indiquée par la présence de pics chromatographiques additionnels. Les temps de migration des produits de clivage indiquent la taille des fragments et donc l'emplacement approximatif du ou des mésappariement(s).

12 Consignes étape par étape

12.1 Installation/Etalonnage INITIAL de la DHPLC

Lorsque vous réglez la plaque SURVEYOR Nuclease pour une analyse sur le système DHPLC, veuillez vous reporter à l'***Appendice A.3 Exigences du Système HPLC en phase dénaturants (DHPLC)***.

12.2 Considérations avant l'analyse d'échantillons *KRAS*

Avant de lancer l'analyse d'échantillons sur le système DHPLC un étalon de taille d'ADN adéquat doit être testé pour s'assurer que le système fonctionne correctement. Le personnel de laboratoire utilisant l'instrument doit vérifier la qualité de la résolution de l'étalon de taille d'ADN avant de procéder à l'analyse.

12.3 Considérations relatives aux matrices

1. Pour une matrice d’ADN isolée à partir échantillons FFPE, adoptez les procédures de laboratoire habituelles pour évaluer la qualité et la quantité d'ADN extrait et vérifier la présence d'une matrice amplifiable par PCR.
2. Le ratio d'absorption 260/280 doit être supérieur à 1,80.
3. Pour accélérer la préparation de la PCR, la concentration de la matrice de travail de chaque échantillon doit être de 12,5 ng/µL. Diluez la matrice d'ADN dans une eau de qualité biologie moléculaire lorsque nécessaire.

12.4 Considérations relatives aux flux de travail

Le kit est conçu pour permettre l'analyse de 100 réactions. Des lots d'échantillons plus restreints peuvent être analysés mais les contrôles du kit et un «Contrôle sans matrice» devront être inclus avec chaque lot d'échantillons. Le kit contient suffisamment de matériels de contrôle pour 100 réactions quelle que soit la taille du lot d'échantillons à utiliser.

En général, le traitement des échantillons devra être réalisé du début à la fin en observant les descriptions de ce manuel d'utilisation. Dans le cas où le traitement d'un échantillon serait interrompu avant que toutes les étapes n'aient été achevées, l'ADN devra être conservé à -20 °C jusqu'à la réalisation de l'étape suivante. Cependant, il faudra éviter d'exposer un échantillon congelé à des cycles de congélation/décongélation répétés ainsi que de conserver entre -18 et -25 °C des produits d'ADN amplifié par PCR ou de digestion SURVEYOR Nuclease pendant des périodes prolongées (>1 semaine).

L'analyse des échantillons doit correspondre au flux de travail illustré ci-dessous:

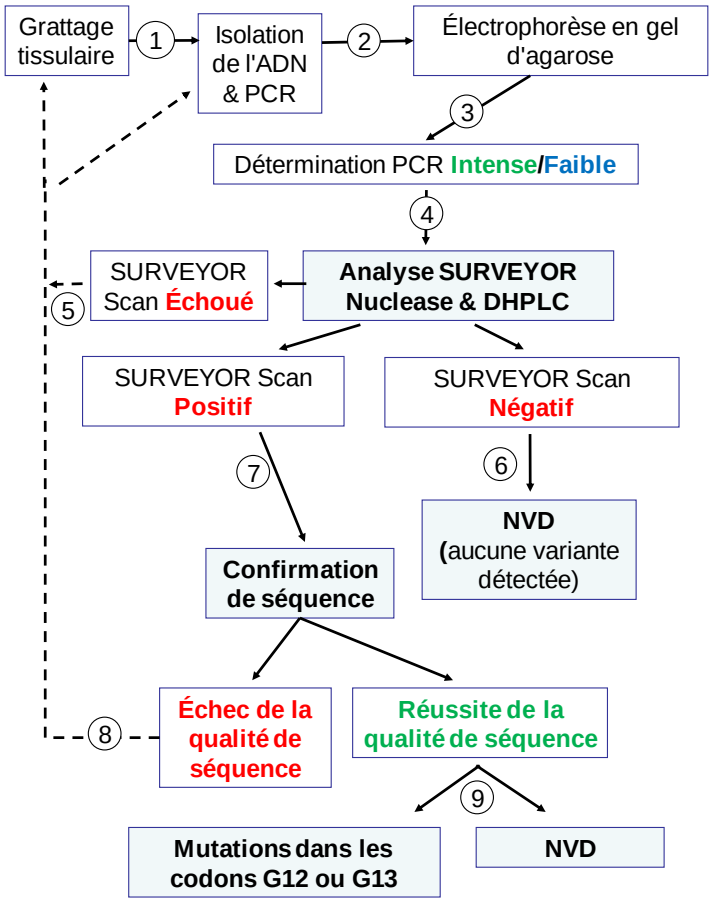


Figure 3 Flux de Travail de l'analyse avec le kit SURVEYOR Scan *KRAS*

Remarques sur la Figure 3

1. Isolez l'ADN du FFPE en utilisant les procédures de laboratoires standard.
2. Effectuez la PCR et vérifiez la qualité de l'ADN par électrophorèse en gel.
3. Notez si la bande PCR est **Intense** (≥20 ng/µL) ou **Faible** (<20 ng/µL).

Si des bandes PCR multiples sont présentes, préparez un nouvel ADN génomique à partir du prélèvement FFPE.

4. Avec les échantillons relevés comme étant PCR Intense ou PCR Faible après amplification par PCR, procédez au traitement SURVEYOR Nuclease et à l'analyse avec le système DHPLC.

   Notez qu'avec les produits de PCR faibles il se peut que l'ADN soit insuffisant pour générer des résultats significatifs sur la plate-forme DHPLC, mais il y aura cependant suffisamment d'ADN pour le séquençage.

5. Voir Appendice B – Guide de résolution des problèmes pour y trouver des exemples de résultats SURVEYOR Scan échoués. Tous les échantillons présentant un résultat SURVEYOR Scan échoué doivent être retraités comme suit:
   a. Répéter la procédure de PCR s'il reste suffisamment d'ADN génomique.
   b. Ré-extraire l'ADN du tissu FFPE; ceci constitue le second choix car il est généralement peu conseillé de recouper un autre bloc de tissu FFPE.
   c. Si un autre bloc ou section est utilisé, le test devra être recommencé dans son intégralité étant donné que les différences des digestions peuvent être dues à l'hétérogénéité de la tumeur.
6. En l'absence de pics de clivage visibles, enregistrer le résultat SURVEYOR Scan comme étant négatif, soit NVD = Aucune variante détectée.
7. Si un échantillon présente des produits de clivage SURVEYOR Nuclease (non correspondant au Wild-Type Control), ils devront faire l'objet d'un séquençage de confirmation.
8. Si une analyse de séquençage de confirmation est inacceptable:
   a. Répéter la procédure de PCR s'il reste suffisamment d'ADN génomique.
   b. Ou ré-extraire l'ADN du tissu FFPE; ceci constitue le second choix car il est généralement peu conseillé de recouper d'autres lames d'un bloc de tissu FFPE.
9. Si l'analyse de confirmation de la séquence est acceptable, les résultats devront indiquer soit:
   a. une séquence Wild-Type, c'est-à-dire aucune variante détectée (NVD); ou
   b. un variant détecté. Lorsque la confirmation de séquence indique un changement de base entraînant un changement au niveau de l'acide aminé aux positions:
      i. codon 12; ou
      ii. codon 13

   relever comme mutation *KRAS* positive.

Remarque: il est possible d'obtenir un résultat SURVEYOR Scan positif qui indique également 'Aucune variante détectée' à partir d'un test de séquençage de confirmation. Le seuil de détection (LOD) de SURVEYOR Nuclease sur le système DHPLC se situe à 2% mutant dans 98% d'ADN Wild-Type pour certaines mutations, tandis que le LOD de séquençage est d'environ 10-25% mutant dans 90-75% d'ADN Wild-Type.

Si un échantillon est 100% d'ADN mutant, aucun hétéroduplexe ne peut être formé et l'échantillon apparaît comme étant “Wild-Type”. Toutefois, les échantillons de biopsie tumorale contiendront des cellules Wild-Type en raison de l'hétérogénéité de la tumeur et/ou de la contamination de tissus normaux; noter que ce kit détecte 5% Wild-Type avec des traces identiques à 5% d'ADN mutant.

Remarque: Les résultats SURVEYOR Scan positifs peuvent découler de changements des bases autres que ceux qui activent le *KRAS*. Bien que ces mutations soient rares, une confirmation par une autre méthode, telle que le séquençage d'ADN, sera alors nécessaire avant d'enregistrer un résultat SURVEYOR Scan Positif en tant activateur de mutation du *KRAS*.

Remarque: le processus de fixation dans du formol utilisé au cours de la préparation des échantillons FFPE de biopsie tumorale peut entraîner une désamination des cytosines. Cette désamination convertit la cytosine en uracile. La polymérase interprétera cet uracile comme étant une thymine et incorporera une adénine dans les brins copiés. Ceci semblera être une mutation là où le G normal sera remplacé par un A entraînant une mutation de GC à AT due au processus de fixation et non pas une véritable mutation somatique. Il s'agit là d'événements rares mais s'ils sont copiés de façon précoce au cours du cycle de PCR, ils ressembleront à des mutations. Ils ne se répètent pas au cours d'une réanalyse.

Les exemples de mutations pouvant se produire suite à la désamination de cytosines qui seraient prises en compte dans le choix du traitement du patient comprennent notamment:

- Codon 12: AGT (G12S) et GAT (G12D)
- Codon 13: AGC (G13S), GAC (G13D) et GGT (G13G, une mutation silencieuse)

Il est par conséquent conseillé que toute mutation de ce type soit confirmée par double analyse du même ADN génomique ou que tous les échantillons soient soumis à une double analyse à partir du début de l'analyse.

12.5 Protocole d'amplification

1. La solution dNTP Transgenomic pré mélangée (PN 703065) est fournie à une concentration de travail de 10 mM de désoxynucléotide (soit 2,5 mM de chacun des quatre désoxynucléotides).
2. Les amorces sens et antisens *KRAS* Exon 2 Forward et Reverse (PN 710155F/R) sont fournies à 10 µM.
3. Sortez les amorces de 10 µM, la solution de dNTPs pré mélangée et DNA Polymerase 10X PCR Buffer (PN 703315) du congélateur et faites-les décongeler sur de la glace.
4. Une fois dégelés, vortexez tous les composants du kit (~10 secondes) pour les mélanger complètement, passez-les rapidement à la centrifugeuse (~10 secondes) pour vous assurer qu'aucun liquide ne reste sur le couvercle des tubes et placez-les sur de la glace.
5. Préparez le Mélange Maître sur de la glace.
6. Utilisez le tableau suivant comme guide pour préparer le Mélange Maître pour les réactions de l'Exon 2 du *KRAS*:

Nombre de réactions:	**10**
Calcul du Volume:	
Volume d'eau (µL)	**330****
DNA Polymerase 10X PCR Buffer (µL)	50
dNTPs (µL)	40
KRAS Primer Exon 2 Forward (µL)	25
KRAS Primer Exon 2 Reverse (µL)	25
DNA Polymerase (µL)	10
Volume total du Mélange Maître:	**48,0**

****Remarque: L'utilisateur devrait s'efforcer de disposer d'au moins 25 ng d'ADN pour 50 µL de réaction.** Lorsque les concentrations d'ADN extraites sont inférieures à 12,5 ng/µL, augmentez le volume d'ADN extrait proportionnellement afin d'assurer 25 ng par réaction. Faites également diminuer le volume d'eau du Mélange Maître de la même quantité pour parvenir à 50 µL par réaction. L'ADN extrait de tous les échantillons préparés avec ce Mélange Maître devra également être dilué à un niveau de concentration approximativement égal. L'utilisation de concentrations d'ADN extrait inférieures à 5 ng/µL n'est pas conseillée.

7. Calculez les volumes requis pour tout Mélange Maître en vous reportant au graphique ci-dessus; notez que:

   Pour ce Mélange Maître, trois réactions supplémentaires seront nécessaires pour le Contrôle *KRAS* Wild-Type*, KRAS* Positive Control Exon 2 et le Contrôle sans matrice *KRAS* Exon 2 (NTC).

   Remarque: **Prendre en compte qu'un volume de Mélange Maître légèrement supérieur à ce calcul sera nécessaire pour remédier à toute perte survenant pendant le pipetage.**

8. Étiquetez les tubes de 0,2 mL-PCR, ou puits d'une plaque de 96 puits avec les informations appropriées relatives aux échantillons.
9. Étiquetez un tube de centrifuge de 2,0 mL pour la préparation du Mélange Maître.
10. Ajoutez le volume requis d'eau de qualité biologie moléculaire au tube de centrifugation de 2,0 mL portant l'étiquette «Mélange Maître».
11. Ajoutez la quantité requise de DNA Polymerase 10X PCR Buffer au tube contenant le Mélange Maître.
12. Ajoutez le volume requis de 10 mM dNTPs au tube de Mélange Maître.
13. Ajoutez le volume requis de *KRAS* Forward Primer au tube de Mélange Maître.
14. Ajoutez le volume requis de *KRAS* Reverse Primer au tube de Mélange Maître.
15. Retirez le DNA Polymerase (PN 703310) du congélateur.
16. Centrifugez le DNA Polymerase pendant ~10 secondes.
17. Vortexez le DNA Polymerase pendant ~10 secondes.
18. Ajoutez le volume requis de DNA Polymerase au tube contenant le Mélange Maître.
19. Rebouchez le tube de Mélange Maître.
20. Avant utilisation, vortexez le tube de Mélange Maître pendant ~30 secondes et passez-le à la centrifugeuse pendant~10 secondes.
21. Conservez-les sur de la glace jusqu'à utilisation.
22. Pipetez 48,0 µL (voir remarque ci-dessus à l'étape 6) de Mélange Maître dans les puits appropriés, en changeant les embouts de pipettes à chaque fois si vous utilisez un pipeteur à canal unique. Si vous utilisez un pipeteur à répétition, assurez-vous qu'il n'y ait pas d'éclaboussures ou de déversement de puits à puits. Maintenir la plaque sur de la glace.
23. Ajoutez 2,0 µL (voir remarque ci-dessus à l'étape 6) de matrice d'ADN de chaque échantillon, ou d'eau (contrôle sans matrice - NTC) dans les puits appropriés. Utilisez des embouts de pipettes différents pour chaque échantillon et évitez toute contamination croisée des échantillons par éclaboussures. Bouchez les puits contenant les échantillons d'ADN et de NTC avec les bandes à 8-capuchons (si vous utilisez une plaque de 96-puits) ou bouchez les tubes de 0,2 mL-PCR. Faites attention à ce que les bouchons soient correctement placés.
24. N'ouvrez le kit de matrice de contrôle d'ADN qu'à ce stade (PN 710131, 710135), en ouvrant les tubes un par un. Pipetez 2,0 µL de chaque matrice de contrôle en dernier pour éviter les possibilités de contamination des échantillons d'ADN. Rebouchez de nouveaux chaque puits avec les bandes de 8-capuchons (si vous utilisiez une plaque de 96-puits) ou rebouchez les tubes de 0,2 mL-PCR. Faites attention à ce que les bouchons soient correctement placés.

    REMARQUE: Observer les bonnes pratiques qui requièrent de placer les Contrôles sans matrice (NTC) dans des puits non adjacents au Positive Control ou aux échantillons.

    REMARQUE: Pour obtenir des suggestions sur la méthode de préparation des plaques de 96 puits de tous les Exons 2-4 *KRAS* et *NRAS*, voir l'***Appendice A.1 Plan de configuration des plaques pour les kits SURVEYOR Scan***.

25. Vortexez (à une vitesse d'environ 1/2) pendant 10 secondes.

26. Centrifugez pendant 1-2 minutes pour vous assurer que toutes les solutions soient recueillies au fond des puits ou des tubes. Vérifiez que les solutions soient au fond de chaque puits ou tube. Si ce n'est pas le cas, recommencez la centrifugation.

12.7 Programme du thermocycleur pour le protocole d'amplification

1. Utilisez le protocole de thermocycleur suivant pour l'amplification par PCR et la formation d'hétéroduplexes:

Dénaturation Initiale		
	95 °C	5 minutes
Amplification par essais (touchdown)		
15 cycles	95 °C 62 °C, -0,5 ºC/cycle 72 °C	30 secondes 30 secondes 25 secondes
Amplification		
30 cycles	95 °C 55 °C 72 °C	30 secondes 30 secondes 25 secondes
Extension finale		
1 cycle	72 °C	2 minutes
Formation d'hétéroduplexes		
	95 ºC	2 minutes
	≤12 °C	Maintien

12.8 Contrôle qualité des produits de PCR

1. Il est conseillé que la qualité et la quantité des amplicons soient évaluées par électrophorèse sur gel (ou moyens équivalents) avant de procéder à la digestion SURVEYOR Nuclease.
2. Analysez un aliquot du produit PCR un marquer de poids moléculaire d'ADN100-bp.
3. Utilisez marquer de poids pour estimer la concentration d'ADN amplifié.
4. Seule une bande unique supérieure à 20 ng/µL, correspondant au produit PCR principal, devrait être observée.
5. Si de multiples bandes sont présentes, assurez-vous que la qualité de la matrice d'ADN utilisée était suffisante (voir ***Appendice B – Guide de Résolution des Problèmes***).
6. Si aucun produit n'est observé, assurez-vous que la qualité de la matrice d'ADN utilisée était suffisante (voir ***Appendice B – Guide de Résolution des Problème****s*). Si la qualité correspond aux spécifications, augmentez le volume de matrice à 4,0 µL par 50 µL de réaction (réduisez le volume d'eau par réaction à 31,0 µL).
7. Aucun produit PCR ne doit être visible dans l'échantillon du contrôle sans matrice. Si des produits d'ADN sont visibles avec ce contrôle, il est probable qu'une contamination ait eu lieue; dans ce cas, voir ***Appendice B - Guide de Résolution des Problèmes.***
8. Déterminez la PCR comme Robuste ou Faible.
    a. La PCR robuste devrait posséder une bande unique supérieure ou égale à 20 ng/µL.
    b. La PCR faible devrait posséder une bande unique inférieure à 20 ng/µL.
    c. Procédez à la digestion par SURVEYOR Nuclease avec les scores de PCR robustes et faibles.

Conseil: à ce stade, les produits PCR peuvent être conservés à des températures inférieures ou égales à -20 ºC pendant une durée d'une semaine maximum.

12.9 Digestion SURVEYOR Nuclease

1. Une fois que l'échantillon PCR est considéré d'une qualité et d'une quantité suffisantes, effectuez la digestion SURVEYOR Nuclease telle que décrite ci-dessous.
2. Décongelez les tubes contenant la 0.15 M $MgCl_2$ Solution et le SURVEYOR Enhancer Cofactor sur de la glace.
3. Ajoutez 10,0 µL de chaque matrice amplifiée par PCR dans un nouveau tube de 0,2 mL-PCR ou dans le puits d'une plaque de 96-puits.
4. Préparez un mélange frais de 0.15 M $MgCl_2$ Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 et SURVEYOR Nuclease W (mélange SURVEYOR Nuclease).

Utilisez le tableau ci-dessous comme guide pour préparer un Mélange Maître de digestion SURVEYOR Nuclease pour l'analyse d'échantillons multiples. L'exemple ci-dessous comporte les volumes pour un Mélange Maître de 10 échantillons.

Prendre en compte qu'un volume de Mélange Maître légèrement supérieur à ce calcul sera nécessaire pour remédier à toute perte survenant pendant le pipetage.

Nombre de Réactions de Digestion SURVEYOR Nuclease:	**10**
Calcul du Volume:	
0.15 M $MgCl_2$ Solution (µL)	**10,0**
SURVEYOR Enhancer Cofactor (µL)	**10,0**
SURVEYOR Enhancer W2 (µL)	**10,0**
SURVEYOR Nuclease W (µL)	**20,0**
Volume total du Mélange Maître :	**50,0**
Ajoutez **5 µL** de Mélange Maître SURVEYOR Nuclease à échantillon amplifié par PCR (µL)	**10,0**
Volume de Réactions de Digestion SURVEYOR Nuclease total:	**15,0**

a. Centrifugez chaque réactif avant de l'utiliser.

b. Vortexez légèrement chaque réactif avant de le pipeter; le centrifuger brièvement pendant ~10 secondes après chaque étape de vortex.

c. Pour chaque digestion, ajoutez les composants suivants à un tube de 0,2 mL-PCR (ou plus grand) pour micro centrifuge.

1.0 µL 0.15 M $MgCl_2$ Solution (PN 708027)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer Cofactor (PN 708049)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer W2 (PN 710161)
2,0 µL SURVEYOR Nuclease W (PN 710160)

Ou ajoutez 5 µL de Mélange Maître préparé comme indiqué dans le tableau ci-dessus.

5. Vortexez légèrement le Mélange Maître de digestion SURVEYOR Nuclease pendant 10 secondes à petite vitesse.
6. Centrifugez le Mélange Maître de digestion SURVEYOR Nuclease pendant 10 secondes à petite vitesse.
7. Placez le Mélange Maître de digestion SURVEYOR Nuclease sur de la glace jusqu'à utilisation.

Remarque: Le Mélange Maître de digestion SURVEYOR Nuclease préparé à l'Étape 7 doit être utilisé immédiatement car SURVEYOR Nuclease W se désactive au fil du temps en présence des autres composants du Mélange Maître de digestion SURVEYOR Nuclease Digest Master Mix.

8. Pipetez un aliquot de 5,0 µL du Mélange Maître SURVEYOR Nuclease dans chaque tube ou puits contenant 10,0 µL d'aliquot de produit amplifié par PCR (voir Étape 3 ci-dessus).

9. Lorsque le pipetage est terminé, centrifugez les tubes de 0,2 mL-PCR ou la plaque de 96 puits pendant for 10 secondes.
10. Vortexez doucement les tubes de 0,2 mL-PCR ou la plaque de 96 puits pendant for 10 secondes.
11. Centrifugez pendant 10 secondes à petite vitesse (cette étape est particulièrement importante si la digestion se produit dans un appareil sans couvercle chauffé).
12. Incubez à 42 °C pendant 30 minutes.
13. Ajoutez 1,0 µL SURVEYOR Stop Solution (PN 708030) dans chaque tube ou puits et vortexez délicatement (le volume total de réaction SURVEYOR Nuclease est de 16,0 µL).

Astuce: les produits de digestion SURVEYOR peuvent être conservés à ≤ -20 ºC pendant une semaine maximum.

14. Chargez les échantillons digérés sur un système DHPLC.

Remarque: Pour obtenir des suggestions de paramètres de gradients utilisables sur le système DHPLC pour analyser les échantillons digérés SURVEYOR Nuclease, veuillez consulter http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.

13 Procédures de contrôle

13.1 Contrôle qualité du SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD

Des ADN plasmidiques de contrôle sont compris dans le kit pour permettre des contrôles de qualité à des étapes spécifiques de la procédure de test. Pour le Protocole d'amplification, ces contrôles fournissent le moyen d'assurer que les mélanges maîtres soient correctement préparés et que l'amplification fonctionne correctement. Des contrôles sans matrice (d'où de l'eau est ajoutée à la place de la matrice d'ADN) sont également nécessaires pour vérifier la contamination possible de composants du kit par toute matrice d'ADN étrangère.

Au stade de digestion SURVEYOR Nuclease, les amplicons issus de ces trois ADN plasmidiques de contrôle fournissent un moyen efficace pour vérifier que les conditions de réaction de clivage (conditions d'incubation et de préparation du Mélange Maître de digestion SURVEYOR Nuclease) étaient satisfaisantes. Au stade de l'analyse, les chromatogrammes du système DHPLC des amplicons de contrôle digérés SURVEYOR Nuclease permettent d'évaluer l'endroit où les pics des produits de clivage correspondant aux mutations de l'Exon 2 de *KRAS*, même à faible niveau, vont éluer (voir la ***Figure 4***). Il se peut que les pics des produits de clivage correspondant à d'autres mutations de l'Exon 2 de *KRAS* éluent dans des positions légèrement différentes.

Si les amplicons PCR ne correspondent pas aux résultats obtenus lors du Contrôle Qualité des Produits de PCR, consultez l'***Appendice B - Guide de Résolution des Problèmes*** ou contactez le service d'assistance technique Transgenomic avant de passer aux étapes suivantes de l'analyse des échantillons.

13.2 Utilisation des ADN plasmidiques de contrôle

Ce kit est fourni avec deux ADN de contrôle:

KRAS Control Wild-Type; PN 710131
KRAS Positive Control Exon 2; PN 710135

Ces ADN de contrôle sont des plasmides avec inserts. Le Positive Control contient deux plasmides: un mélange du *KRAS* Control Wild-Type et un clone de mutation différent du Wild-Type au niveau d'une seule paire de bases. Les contrôles sont fournis dans des tubes différents, chacun à une concentration de 10^5 copies/µL.

Les amorces *KRAS* Exon 2 Forward et Reverse PCR nécessaires à l'amplification par PCR sont fournies séparément dans le kit. Veuillez suivre les instructions figurant dans le ***Protocole d'amplification***, Digestion avec ***SURVEYOR Nuclease et l'Analyse de KRAS Exon avec SURVEYOR Nuclease*** pour l'utilisation de ces contrôles.

NOUS RECOMMANDONS VIVEMENT QUE LES UTILISATEURS PROCÈDENT À DES EXPERIMENTATIONS AVEC LES CONTRÔLES SEULS AVANT D'ANALYSER LES ÉCHANTILLONS GÉNOMIQUES

14 Interprétation des résultats

14.1 Analyse de *KRAS* Exon 2 avec SURVEYOR Nuclease

À des fins de comparaison et de contrôle, effectuez toujours une digestion SURVEYOR Nuclease sur chacun des contrôles (Wild-Type et Positive Controls), sur un contrôle sans matrice et sur des matrices d'ADN, en réalisant cette vérification sur la même plaque d'échantillons du système DHPLC.

Au stade de digestion SURVEYOR Nuclease, les amplicons issus de ces ADN de contrôle plasmidiques valident que les conditions de réaction de clivage (conditions d'incubation et de préparation du mélange SURVEYOR Nuclease) sont satisfaisantes. Au stade de l'analyse, les traces des amplicons de contrôle digérés par SURVEYOR Nuclease du système DHPLC permettent d'évaluer l'endroit où les fragments d'ADN résultant du clivage au niveau des sites de mésappariement des mutations spécifiques, même à faible niveau, vont éluer (voir ***Figure 4***).

Si soit les amplicons PCR soit les fragments de clivage SURVEYOR Nuclease dérivés des ADN de contrôle ne correspondent pas aux résultats affichés, consultez l'***Appendice - Guide de Résolution des Problèmes*** ou contactez l'assistance technique Transgenomic avant de passer aux étapes suivantes de l'analyse des échantillons.

Les exemples fournis ci-dessous ne sont qu'indicatifs et ne doivent PAS être utilisés pour déterminer l'identité d'aucune mutation. La confirmation de l'identité de toute mutation est nécessaire afin de déterminer sans aucune équivoque la présence d'un changement spécifique de bases au niveau de l'Exon 2 du gène *KRAS*.

SURVEYOR Nuclease clive au niveau de tous les mésappariements résultant de la formation d'hétéroduplexes entre l'ADN Wild-Type et l'ADN mutant, et non pas uniquement au niveau des mutations de l'Exon 2. SURVEYOR Nuclease confirme la présence éventuelle d'un mésappariement. L'identification du changement de base spécifique à la mutation est nécessaire afin de connaître la situation d'activation du gène *KRAS*, et elle doit être confirmée par une autre méthode telle que le séquençage.

14.2 Lecture des données d'analyse SURVEYOR Scan

Inspectez les chromatogrammes et comparez ceux des Wild-Type et Positive Controls avec ceux de l'échantillon. Vérifiez si le chromatogramme de l'échantillon est similaire ou différent du schéma du Wild-Type S'il est différent, l'échantillon devra être considéré "SURVEYOR Scan Positif" et envoyé pour être analysé par séquençage de l'ADN. Voir la ***Figure 4*** pour y trouver des exemples et l'***Appendice B – Guide de Résolution des Problèmes***, ***Problèmes 7*** & ***8*** pour y trouver des exemples de ce genre d'échantillons.

Tout échantillon avec un schéma SURVEYOR Nuclease différent du Wild-Type devra faire l'objet d'une confirmation de séquence, même s'il n'est pas identique au Contrôle. Voir ***Appendice B – Guide de Résolution des Problèmes***, ***Problème 7*** pour y trouver un exemple de ce genre d'échantillon.

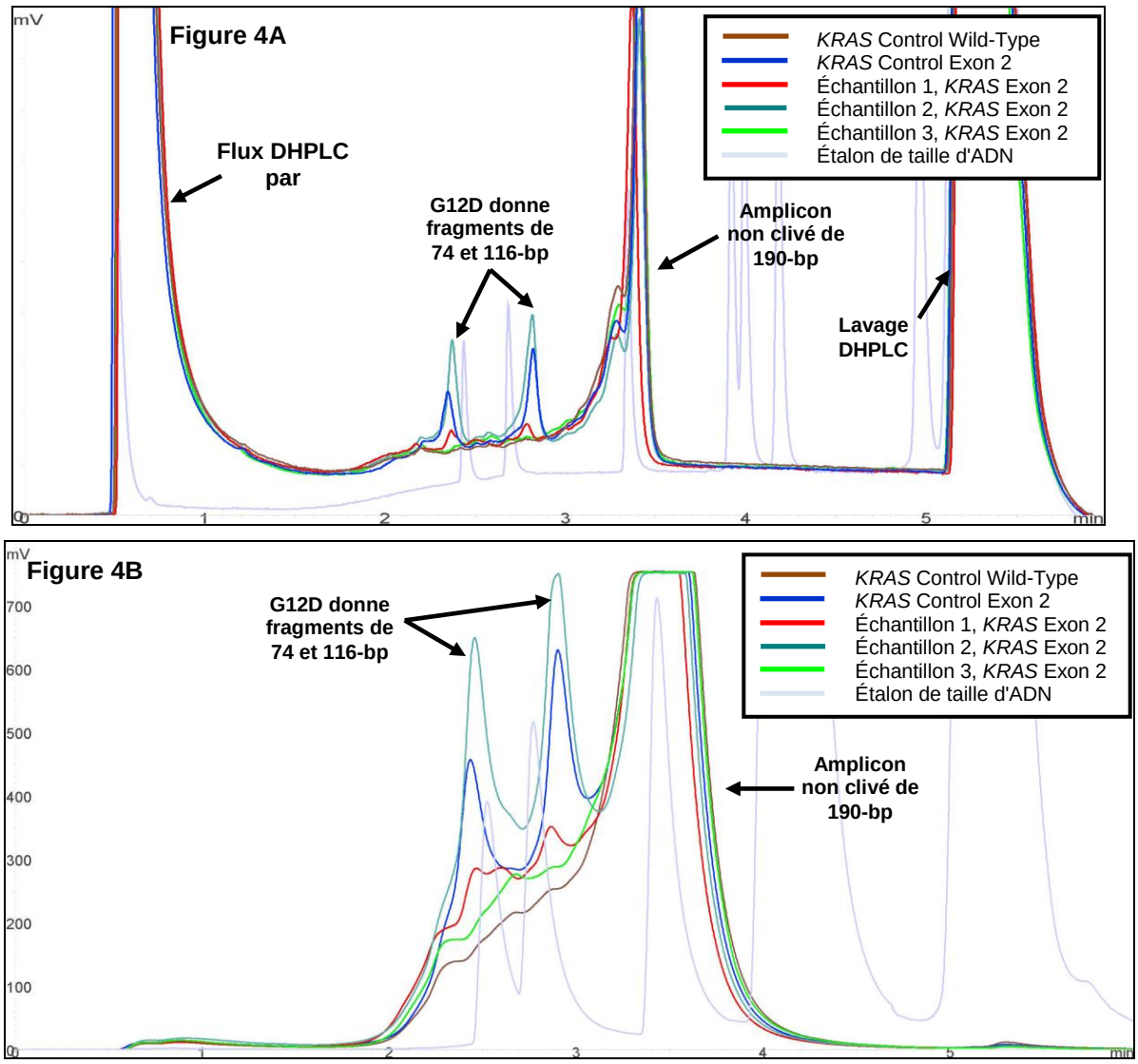
Lorsque cela vous est demandé, zoomez sur la région d'intérêt et superposez les électrophérogrammes de l'échantillon avec le Wild-Type Control de cet amplicon.

Notez toute différence entre le Wild-Type contrôle et l'échantillon analysé.

Important! Après avoir minutieusement examiné chaque échantillon, l'examinateur de données pourra voir si des échantillons adjacents sur la plaque d'analyse possèdent des résultats positifs identiques SURVEYOR Scan. Si des résultats positifs identiques sont observés, ils peuvent être le résultat d'une contamination entre échantillons ou entre contrôles et l'analyse doit être répétée.

14.3 Exemples de résultats

Exemples de résultats obtenus en utilisant le SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD avec DHPLC indiqués à la ***Figure 4*** ci-dessous. Dans ces exemples, en utilisant des WAVE® 4500 Systems avec des détecteurs UV et de fluorescence, le processus indiqué dans la section Consignes étape par étape a été observé à la lettre. Pour obtenir des suggestions de paramètres de gradients utilisables sur le système DHPLC pour analyser les échantillons digérés SURVEYOR Nuclease, veuillez consulter http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.



Figures 4A et 4B: Analyse WAVE DHPLC par détection UV (Figure 4A) et fluorescence (Figure 4B) des produits de la digestion SURVEYOR Nuclease de *KRAS* Positive Control Exon 2 et *KRAS* Control Wild-Type et ADN de CCR isolé de sections de FFPE. Au moment de l'examen visuel des chromatogrammes, les échantillons digérés doivent être comparés au Wild-Type Control (ligne marron). Le *KRAS* Positive Control Exon 2 (ligne bleue) est un mélange de plasmides G12S Wild-Type et mutant qui produisent des pics de digestion de 73 et 117 bp; ce contrôle indique que l'étape de digestion SURVEYOR Nuclease fonctionne correctement et indique la région du chromatogramme qui doit être soumise à une inspection visuelle pour déterminer si l'échantillon concerné doit faire l'objet d'une analyse de séquençage. Si l'on compare les modèles de digestion des Échantillons 1-3 avec l'électrophérogramme non digéré du Wild-Type, il est évident que les Échantillons 1 et 2 (lignes rouge et turquoise) ont des mutations probables et doivent être soumis à un séquençage pour vérifier la présence ou l'absence d'une mutation au codon concerné. L'échantillon 3 (ligne verte) a des chromatogrammes similaires à ceux observés pour le Wild-Type Control et n'ont pas besoin d'être soumis à une analyse de

séquençage d'ADN. Notez que le résultat du séquençage constitue le résultat définitif étant donné qu'il peut y avoir d'autres mutations non pertinentes produisant les mêmes tailles de fragment.

15 Caractéristiques et performance

15.1 Seuil de détection des mutations avec les kits SURVEYOR Scan

La validation des kits SURVEYOR Scan pour les plateformes DHPLC en utilisant des clones plasmidiques de toutes les mutations indiquées a montré que les pics SURVEYOR Nuclease peuvent être détectés dans un mélange mutant de 2-5% dans un fond de type Wild-Type.

Le séquençage systématique des brins sens et anti-sens ne parvient souvent pas à détecter les mutations dans les mélanges d'ADN Wild-Type dont le niveau est inférieur à 10%. Conjointement aux résultats SURVEYOR Nuclease il est possible d'interpréter avec plus de confiance les électrophérogrammes du séquençage des mutations de 5-10%.

Si l'analyse d'un échantillon montre un résultat SURVEYOR Scan positif mais sans mutation *KRAS* ou *NRAS* détectable par le séquençage de l'ADN, nous vous conseillons d'enregistrer un résultat «Aucune Variantion Détectée». Voir «*Considérations Relatives aux Flux de Travail*» pour en savoir plus.

15.2 Confirmation par séquençage

Procédez à un séquençage de confirmation pour tous les résultats SURVEYOR Scan positifs pour déterminer l'identité de la séquence des mutations de l'Exon 2 de *KRAS*.

Ne procédez pas au séquençage de confirmation lorsque le SURVEYOR Scan a présenté un résultat négatif. L'échantillon peut être relevé comme étant Wild-Type ou Aucune variation détectée.

Les amorces Universal Sequencing Primer comprises dans ce kit sont prévues pour le séquençage de confirmation. Il s'agit de l'amorce sens PN 710153F (Universal Sequencing Primer 1) et anti-sens PN 710153R (Universal Sequencing Primer 2).

15.3 Limites du Kit

Des contaminations provenant de l'extraction des échantillons enrobés de paraffine et fixés au formol sont susceptibles d'interférer avec les procédures d'amplification par PCR et de digestion SURVEYOR Nuclease. Les procédures de contrôle qualité présentées dans le ***Contrôle Qualité des Produits de PCR*** servent à vérifier que l'ADN extrait convienne pour être utilisé avec ce kit.

Ce kit a été validé pour être utilisé avec des échantillons cancéreux de tumeurs colorectales provenant de biopsie, enrobés de paraffine et fixés au formol. Il n'a pas été validé pour être utilisé avec d'autres types de cancer ou avec des échantillons de biopsie frais ou congelés.

Pour résoudre les problèmes liés aux résultats non standard et pour obtenir des détails sur les facteurs susceptibles d'avoir un effet sur cette analyse, reportez-vous à l'***Appendice B - Guide de Résolution des Problèmes***, ci-dessous.

Prendre les précautions nécessaires pour éviter les rémanences et contaminations croisées avec ce kit. Le niveau extrême de sensibilité de la méthode d'analyse nécessite de prendre les précautions particulières suivantes:

- Assurez-vous que tous les échantillons soient manipulés de manière à éviter toute contamination croisée entre échantillons
- Travaillez à un poste de travail PCR ou autre espace de travail adapté où la zone de travail n'est pas exposée aux rayons UV avant de préparer les réactions d'amplification par PCR.
- Utilisez une zone ou pièce de travail PCR séparée pour ouvrir les échantillons après leur amplification par PCR afin de procéder au contrôle qualité par électrophorèse en gel.
- La préparation de la digestion SURVEYOR Nuclease doit toujours être effectuée dans une pièce différente de travail PCR que celle dans laquelle la préparation PCR initiale a eu lieu.

- Assurez-vous que les contrôles plasmidiques du kit soient manipulés séparément des échantillons de test à toutes les étapes de l'analyse.
    - Vérifiez que toutes les solutions et puits de contrôles sans matrice et d'échantillons d'ADN soient bouchés avant d'ouvrir les tubes contenant le contrôle plasmidique d'ADN.
    - OCCUPEZ-VOUS DES CONTRÔLES EN DERNIER. Ajoutez le contrôle plasmidique d'ADN dans les tubes approprié uniquement après que TOUS les tubes des contrôles sans matrice et puits d'échantillons aient été rebouchés.
    - Après avoir bouché les tubes de contrôle d'ADN, essuyez TOUS les tubes et capuchons avec un agent destructeur d'ADN (tel que de la Javel à 10%) avant de les transférer dans un autre endroit.
- Assurez-vous que le pipetage des échantillons dans les plaques de 96 puits ne donne pas lieu à une contamination des échantillons des puits adjacents suite à des éclaboussures durant le mélange ou si vous oubliez de changer les embouts de pipette.

Appendice A

A.1 Schéma de configuration des plaques pour les kits SURVEYOR Scan

Le schéma de configuration des plaques suggéré ci-dessous sert à effectuer l'analyse SURVEYOR Scan des sept Exons *KRAS* et *NRAS* en simultané sur 10 échantillons.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A: *KRAS* EX 2	*KRAS* Ex 2 WT	*KRAS* Ex 2 Mut	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
B: *KRAS* EX 3	*KRAS* Ex 3 WT	*KRAS* Ex 3 Mut										
C: *KRAS* EX 4A	*KRAS* Ex 4A WT	*KRAS* Ex 4A Mut										
D: *KRAS* Ex 4B	*KRAS* Ex 4B WT	*KRAS* Ex 4B Mut										
E: *NRAS* EX 2	*NRAS* Ex 2 WT	*NRAS* Ex 2 Mut										
F: *NRAS* Ex 3	*NRAS* Ex 3 WT	*NRAS* Ex 3 Mut										
G: *NRAS* Ex 4	*NRAS* Ex 4 WT	*NRAS* Ex 4 Mut	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼
H:	Vide	Vide	Vide	Vide	Vide	NTC *KRAS* Ex 2	NTC *KRAS* Ex 3	NTC *KRAS* Ex 4A	NTC *KRAS* Ex 4B	NTC *NRAS* Ex 2	NTC *NRAS* Ex 3	NTC *NRAS* Ex 4

Légende : Ex = Exon; WT = Wild-Type; Mut = Mutation; NTC = Contrôle sans matrice.

A.2 Empreintes de l'ADN de contrôle

Les séquences avec une “Empreinte” sont indiquées ci-dessous.

Légende: Les régions où se trouvent les mutations les plus communes figurent en **Violet**. La séquence en MAJUSCULES correspond aux bases codantes; les bases non-codantes sont en minuscules.

Les contrôles ont une “empreinte” génétique indiquée en **Jaune**; cette variation de la séquence *KRAS* Wild-Type dans une région où des mutations ne sont pas prévues peut être utilisée pour résoudre les contaminations éventuelles de l'échantillon par Positive Control. Voir ***Appendice B - Guide de Résolution des Problèmes, Problème 8,*** pour y trouver un exemple d'une trace de contamination de ce genre de SURVEYOR Scan.

“Empreinte” du *KRAS* Exon 2

Taille de l'amplicon**:** 190 bp. Pour la création de l'empreinte génétique du contrôle plasmidique de l'Exon 2 *KRAS*, `TAT` est changé en `ATA`**.** Les codons 12 et 13 sont également mis en évidence ci-dessous.

GCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAAATAGAT

A.3 Exigences du système HPLC en phase dénaturante (DHPLC)

A.3.1 Spécifications de la DHPLC pour les applications SURVEYOR Scan

Les spécifications suivantes correspondent aux exigences minimum en termes de caractéristiques du système DHPLC pour effectuer les tests des kits *KRAS* et *NRAS* SURVEYOR Scan.

Système de distribution de gradient de solvant à haute performance

- Capacité de gradient binaire; haute pression ou basse pression
- Contrôle du débit, plage minimum: 0,7 – 1,6 mL/min
- Précision du débit: ± 2% (H_2O à 20 ºC)
- Dégazeur de solvant

Échantillonneur automatique

- Régulateur thermique pour refroidir les plaques, programmable: 4 à 14 ºC
- Volume d'injection: 5 X -50 µL

Cartouche de séparation

- Conçue pour la séparation des fragments d'ADN double brin, tailles de fragments de 50 bp à 250 bp

Four à régulation thermique de haute précision

- Plage des températures: 40 à 70 ºC
- Précision thermique: ± 0,2 ºC
- Reproductibilité des températures: ± 0,2 ºC
- Linéarité sur la plage complète des températures: ± 2,0 ºC

Alternative de détection 1

- **Détecteur UV/VIS**
  - Gamme de longueurs d'ondes: 190 – 700 nm
  - Source UV: Lampe au deutérium

Alternative de détection 2

- **Détecteur de fluorescence**
  - Gamme de longueurs d'ondes: excitation: 200 – 850 nm; émission: 250 – 900 nm
  - Source de fluorescence: Lampe au xénon de 150W
- **Pompe à colorant fluorescent**
  - Débit fixe à 0,1 mL/min – 20%/+50%
  - Débit pulsé bas

A.3.2 Fonctionnement du système

Pour la programmation et le fonctionnement du système DHPLC consultez et observez les recommandations du fabricant pour l'analyse des fragments d'ADN à deux brins dont la taille se situe entre 50 bp et 250 bp, en ciblant une discrimination de taille de 10 bp ou mieux. Il s'agit de l'intervalle de tailles des fragments après la digestion SURVEYOR Nuclease en utilisant ce kit.

Pour obtenir des suggestions de paramètres de gradients utilisables sur le système DHPLC pour analyser les échantillons digérés SURVEYOR Nuclease, veuillez consulter http://world.transgenomic.com/diagnostic-tools/genetic-analysis-kits/crc-rascan-kits-eu/dhplcsystemsettings.

A.3.3 Entretien des cartouches DHPLC

Observer les recommandations du fabricant pour l'entretien des cartouches DHPLC.

Remarque: l'analyse des réactions SURVEYOR Nuclease nécessitera des protocoles de nettoyage plus fréquents et plus rigoureux que ceux qui sont préconisés pour l'analyse d'échantillons PCR standard. Consultez les directives applicables à votre système DHPLC pour de plus amples détails.

A.4 Configuration du laboratoire pour les tests PCR

Pour produire des résultats de PCR fiables et sans contamination, observer les bonnes pratiques de laboratoire au moment de configurer le laboratoire.

Lors de la planification de la disposition du laboratoire, tenir compte de la nécessité de séparation spatiale des activités de préparation de l'amplification des activités post-amplification par PCR. Il est important de séparer (i) isolation de l'ADN; (ii) amplification PCR; et (iii) activités post-PCR telles que l'ouverture des tubes contenant les échantillons amplifiés en préparation pour les tests sur gels et la préparation d'autres tests tels que test de digestion SURVEYOR Nuclease et séquençage d'ADN.

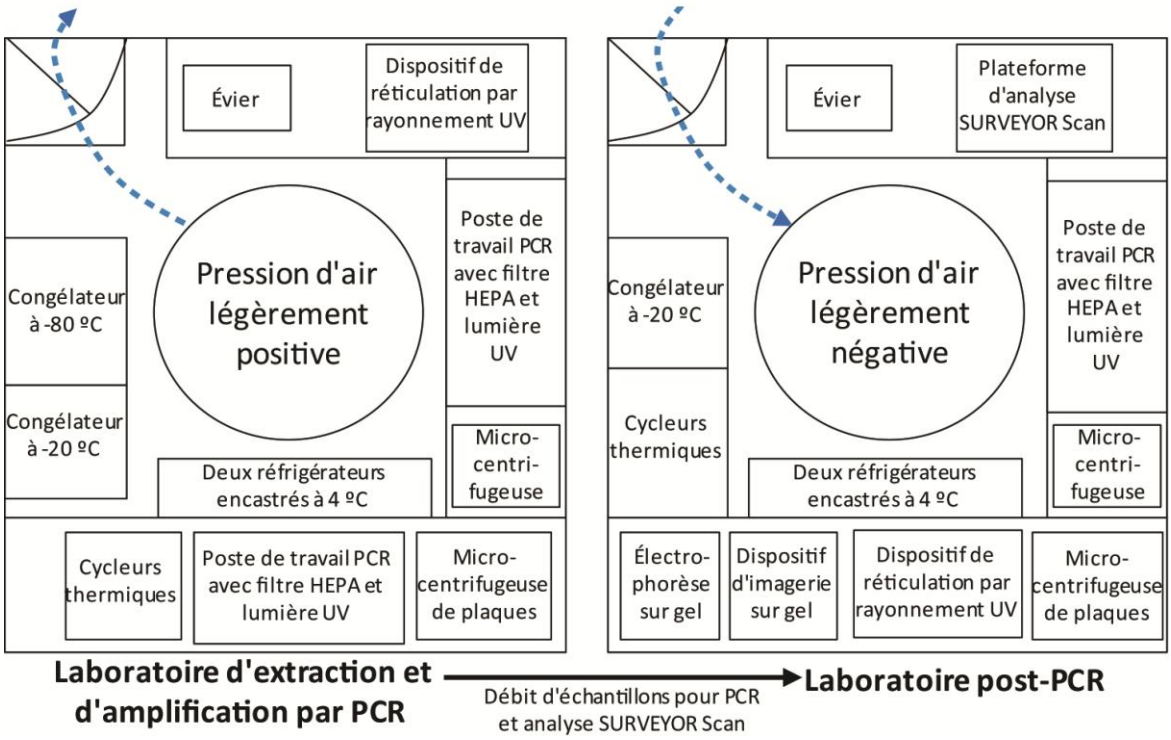
Il est également important de disposer de fournitures et de matériels de laboratoire spécialement destinés à chaque zone et ne pouvant être utilisés que dans cette zone. Le nettoyage des surfaces avec de l'eau de Javel à 10% (v/v) fraîchement constituée chaque semaine, favorisera l'élimination des fragments d'ADN ≤ 500 bp comme matrices pour la PCR. De plus, il pourra être utile de traiter les éléments en plastique et les solutions avec une exposition de 7–10 minutes à une lumière UV à ondes courtes en utilisant un dispositif de réticulation par rayonnement UV.

Remarque: les enzymes et ADN à amplifier **ne devront pas** être traités à la lumière UV.

Le port de vêtements de protection, le changement fréquent des gants et le lavage des mains gantées avec la solution d'eau de Javel à 10% (v/v) avant de prendre place à un poste de travail sont des gestes susceptibles de contribuer largement à réduire les risques de contamination.

Au minimum, il sera nécessaire d'avoir recours à une configuration similaire à la disposition à deux pièces du diagramme ci-dessous spécifiquement conçue pour la PCR et l'analyse avec SURVEYOR Nuclease.

Organisation suggérée de laboratoire PCR


Évier
Dispositif de réticulation par rayonnement UV
Congélateur à -80 ºC
Pression d'air légèrement positive
Poste de travail PCR avec filtre HEPA et lumière UV
Congélateur à -20 ºC
Micro-centri-fugeuse
Deux réfrigérateurs encastrés à 4 ºC
Cycleurs thermiques
Poste de travail PCR avec filtre HEPA et lumière UV
Micro-centrifugeuse de plaques
Évier
Plateforme d'analyse SURVEYOR Scan
Congélateur à -20 ºC
Pression d'air légèrement négative
Poste de travail PCR avec filtre HEPA et lumière UV
Cycleurs thermiques
Micro-centri-fugeuse
Deux réfrigérateurs encastrés à 4 ºC
Électro-phorèse sur gel
Dispositif d'imagerie sur gel
Dispositif de réticulation par rayonnement UV
Micro-centrifugeuse de plaques
Laboratoire d'extraction et d'amplification par PCR
Débit d'échantillons pour PCR et analyse SURVEYOR Scan
Laboratoire post-PCR

A.5 Références Documentaires

1. Amgen News Release (2013) New analyses identify predictive biomarkers for Vectibix® (panitumumab) in patients with metastatic colorectal cancer. http://wwwext.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?-year=2013&releaseID=1820728
2. Peeters M et al (2013) Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res. 19 1902-12*
3. De Roock W et al (2010) Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA 304 1812-20*
4. Peeters M et al (2013) Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol. 31 759-65*
5. Andre T *et al* (2013) Panitumumab combined with irinotecan for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. *Ann Oncol. 24 412-9*
6. Loupakis F et al (2009) KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer 101 715-21*
7. De Roock W et al (2010) Effects of *KRAS*, BRAF, *NRAS*, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol. 11 753-62*
8. Qiu P et al (2004) Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *Biotechniques 36 702-707*
9. Kuang Y et al (2009) Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. 15 2630-6*
10. Mitani N et al (2007) Surveyor nuclease-based detection of p53 gene mutations in haematological malignancy. *Ann. Clin. Biochem. 44 557-9*
11. Engelman JA et al (2006) Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J. Clin. Invest. 116 2695-2706*

Voir également http://world.transgenomic.com/files/literature/482146.pdf pour y trouver des références à propos de SURVEYOR Nuclease et de ses applications.

Appendice B

Guide de Résolution des Problèmes

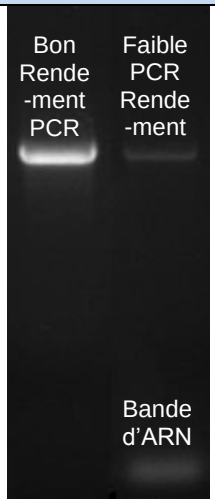
L'utilisation efficace des kits SURVEYOR Scan à utiliser avec DHPLC dépend de la bonne réalisation d'un certain nombre d'étapes. La plus essentielle d'entre elles étant l'amplification par PCR permettant l'enrichissement spécifique d'ADN de taille uniforme en quantité suffisante pour pouvoir être détecté après l'hybridation et le clivage. Cette étape dépend elle-même de la qualité de l'échantillon initial. Il est déconseillé de réaliser l'analyse avec un ADN ne répondant pas aux critères de qualité et de quantité indiqués.

Remarque : si c'est la première fois que vous utilisez SURVEYOR Nuclease, veuillez réaliser les expériences indiquées au chapitre Utilisation des ADN plasmidiques de contrôle après avoir lu et assimilé le chapitre Consignes étape par étape. Veuillez vous procurer les résultats des ADN plasmidiques de contrôle avant de prendre contact avec le service d'assistance technique Transgenomic.

Ce Guide de résolution des problèmes présente une liste de problèmes que vous êtes susceptibles de rencontrer lors de l'utilisation des kits SURVEYOR Scan avec DHPLC, ainsi que des suggestions sur la manière de les résoudre.

Reportez-vous au Manuel d'utilisation du système DHPLC pour obtenir des informations plus détaillées sur le fonctionnement et l'entretien de l'appareil. Le manuel comprend des informations de dépannage et explique les procédures spécifiques pour vérifier et entretenir la performance des colonnes.

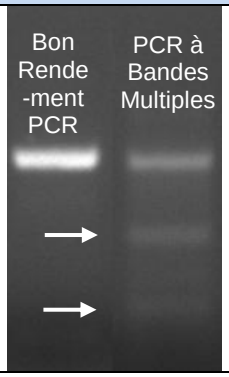
Problème 1 – Faible rendement PCR ou absence de produit PCR au cours de l'analyse en gel d'agarose

FAIBLE RENDEMENT PCR	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
	Mauvaise qualité de l'échantillon d'ADN	Répétez la purification d'ADN; revoyez la méthode de purification utilisée. Si l'ADN extrait du FFPE est trop fragmenté, des blocs alternatifs de FFPE pourront s'avérer nécessaires.
	Trop d'ARN dans l'échantillon ce qui provoque une surestimation de la concentration d'ADN.	Répétez le traitement RNase de l'échantillon d'ADN et repurifiez l'ADN.
	Thermocycleur non calibré	Etalonnez le thermocycleur
	Échantillon insuffisant	Augmentez la quantité d'échantillon.

Remarque: Il faut utiliser de l'ADN de grande qualité issu du FFPE. L'ADN doit avoir une concentration de 25 ng/µL comme déterminé par l'absorption à 260 nm, avoir un ratio d'absorption de 260/280 nm supérieur à 1,8 et être supérieur à 90% d'ADN (à savoir pour ainsi dire sans contamination d'ARNt et d'ARNr comme jugé par l'apparence du gel d'agarose). Conservez les échantillons d'ADN entre -20 °C et -80 °C.

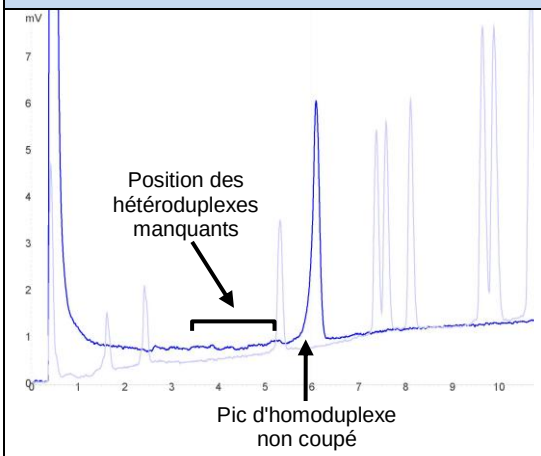
L'analyse de la matrice d'ADN extraite à partir de tissu enrobé de paraffine nécessite la prise de certaines précautions. L'ADN extrait peut être traité avec de l'uracile-ADN-glycosylase pour éviter l'amplification de fragments d'ADN contenant des résidus C désaminés. Souvent, un pourcentage d'absorption élevé du de matière A_{260} extraite à partir de tissu enrobé de paraffine n'est pas bien amplifié lors de la PCR. L'utilisation d'une quantité supérieure d'ADN de départ aide alors souvent à obtenir un produit d'amplification convenable. Il serait également possible de choisir des sections tumorales FFPE présentant un haut pourcentage de cellules tumorales. Il serait aussi possible d'avoir recours à la microdissection, mais il s'agit d'une solution qui prend beaucoup de temps et qui ne serait pas conseillée dans un cadre d'analyses en laboratoire générales.

Problème 2 – Produits de PCR multiples au cours de l'analyse en gel d'agarose

PRODUITS DE PCR MULTIPLES	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
	Température d'annelage trop basse	Contrôlez l'étonnage du thermocycleur

Remarque : La PCR doit conduire à une production suffisamment élevée (supérieure à 20 ng/µL) d'une SEULE espèce amplifiée de taille correcte. L'enzyme DNA Polymerase et le tampon DNA Polymerase 10X PCR Buffer fournis avec ce kit doivent être utilisés pour la PCR. Les amplicons issus des contrôles devront être digérés avec SURVEYOR Nuclease et analysés pour exclure le bruit de fond parasite par comparaison visuelle des profils d'électrophérogramme (voir ***Exemples de Résultats***, ***Figure 4***). Vérifiez chaque produit d'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose (ou par l'analyse du Système DHPLC) avant la digestion pour vous assurer qu'il s'agisse bien d'une seule espèce de la taille attendue.

Problème 3 – Pas de produits de clivage observés lors de l'analyse après traitement SURVEYOR Nuclease des hétéroduplexes

PAS DE PRODUITS DE CLIVAGE	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
	Proportion de mésappariement ciblée trop basse	Vérifiez le test en vous servant des contrôles.
	Formation inefficace d'hétéroduplexes	Suivez correctement la procédure de PCR et d'hybridation. Utilisez de l'ADN fraîchement hybridé par digestion SURVEYOR Nuclease. Effectuez une nouvelle amplification PCR (1) en utilisant la même quantité de matrice d'ADN; (2) en augmentant la quantité d'ADN de départ; ou (3) en isolant de l'ADN frais d'une section de FFPE (la même ou une section différente).
	SURVEYOR Nuclease inactif	Procédez à la réaction Positive Control pour vérifier la performance de l'enzyme. Utilisez uniquement des Mélanges maître SURVEYOR Nuclease fraîchement préparés.

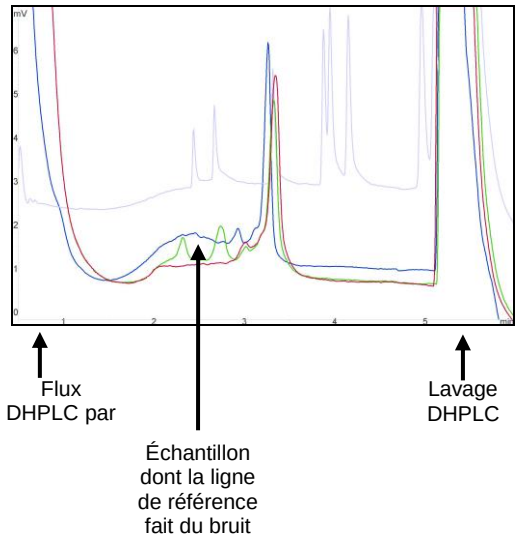
Remarque: SURVEYOR Nuclease clive principalement au niveau des mésappariements des hétéroduplexes. La proportion hétéroduplexes/homoduplexes de l'échantillon hybridé détermine la taille du signal de digestion par l'enzyme SURVEYOR Nuclease. Si la mutation *KRAS* est présente à une très faible concentration dans l'échantillon d'ADN génomique, il se peut que le signal soit trop faible pour donner un résultat positif.

Il est important de veiller à inclure l'étape d'hybridation dans le programme du thermocycleur (voir ***Protocole d'amplification***) afin de maximiser l'efficacité de la formation d'hétéroduplexes. La formation des hétéroduplexes est très irrégulière au cours des réactions par PCR standard.

Remarque: le Ratio signal/bruit est généralement suffisamment élevé pour détecter les mutations présentes à un faible pourcentage dans la matrice d'ADN totale; il est possible de détecter même 2% d'ADN mutant. La ***Figure 4*** illustre les produits de digestion obtenus à partir de l'ADN *KRAS* Positive Control (inclus dans ce kit) et des échantillons FFPE sur un WAVE DHPLC 4500 System. Les produits du clivage sont clairement visibles sous la forme de deux pics élués dont les tailles attendues peuvent être estimées par comparaison à un marqueur de poids moléculaire pour ADN.

Attention: le contenu des tampons PCR disponibles dans le commerce varie sensiblement et leurs formulations ne sont pas toujours définies par les fournisseurs. Plusieurs tampons ne SONT **PAS** compatibles avec une digestion SURVEYOR Nuclease en raison de leur pH ou de la présence d'additifs, d'agents tensio-actifs ou autres ingrédients exclusifs de ces fournisseurs. **NE PAS utiliser d'autres enzymes polymérase ou de tampons polymérase 10X que ceux qui sont fournis dans ce kit.**

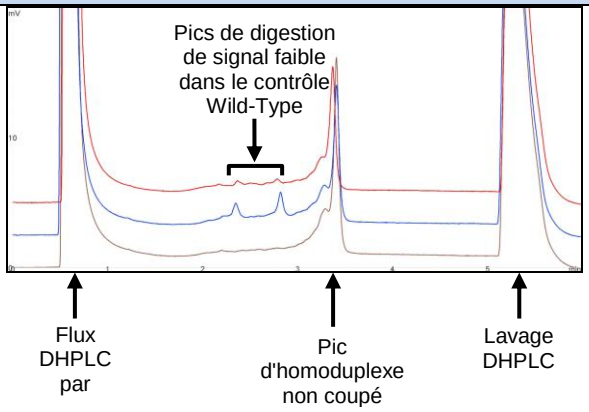
Problème 4 – Bruit de fond élevé après traitement par SURVEYOR Nuclease

BRUIT DE FOND ÉLEVÉ	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
	Étape d'hybridation de qualité non satisfaisante	Suivre les consignes suivantes: 1. Assurez-vous que la concentration d'ADN se trouve dans la fourchette >25 ng/µL. 2. Répétez l'étape de formation des hétéroduplexes en prenant soin de suivre la procédure recommandée, voir 12.7.1.
	Quantité d'ADN trop basse	Vérifiez le rendement et la qualité de la matrice d'ADN
	Produits de PCR non spécifiques	Vérifiez le rendement et la qualité de la matrice d'ADN
	Le SURVEYOR Enhancer W2 et/ou le SURVEYOR Enhancer Cofactor ont perdu de leur activité	Contrôlez la date de péremption du kit.

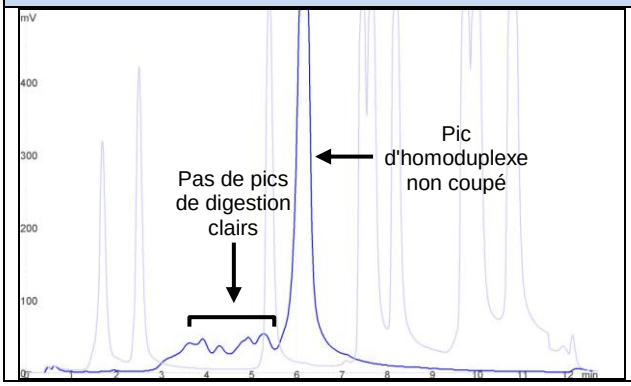
Remarque: SURVEYOR Nuclease coupe également l'ADN à double brin à des endroits d'appariement aléatoires. Ceci produit un bruit de fond après la digestion. Cette activité est supprimée par l'activateur SURVEYOR Enhancer W2 et son Cofactor sans pour autant nuire à la réaction de clivage de mésappariement. L'activateur SURVEYOR Enhancer W2 et le SURVEYOR Enhancer Cofactor sont inclus dans ce kit et doivent systématiquement être utilisés.

Lorsque cette coupe se produit, elle génère des pics mineurs sur le Système DHPLC. La comparaison du produit de digestion des contrôles homoduplexes avec les produits de digestion des échantillons permettra de les identifier.

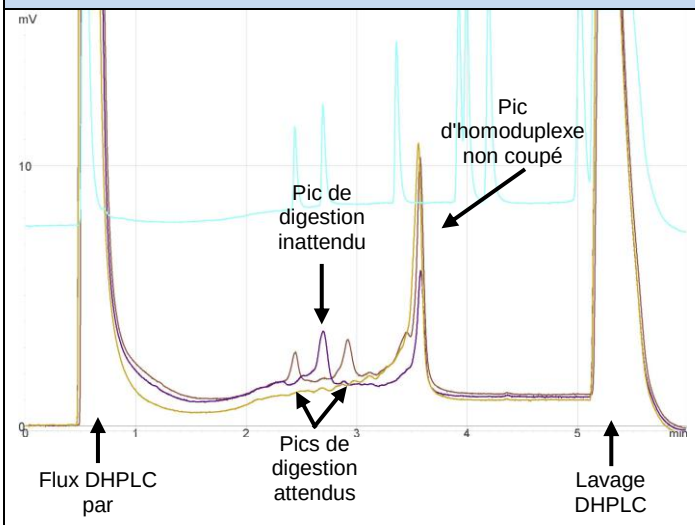
Problème 5 – Pics de digestion SURVEYOR Nuclease dans les contrôles négatifs

PICS DE DIGESTION DANS LES CONTRÔLES NÉGATIFS	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
	Contamination du contenu du kit avec par des contrôles plasmidiques ou des amplicons *NRAS*.	Jetez tous les composants du kit et utilisez un nouveau kit. Contactez le service d'assistance technique Transgenomic pour discuter des causes et sources de contamination potentielles.

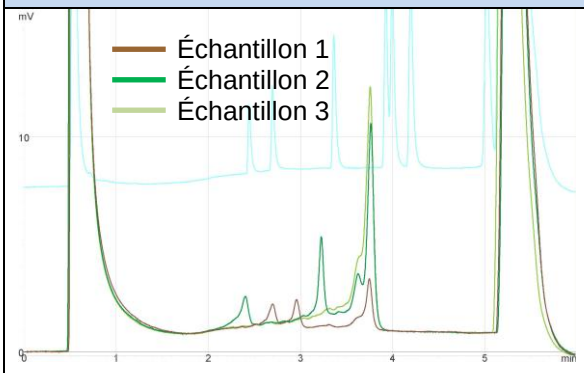
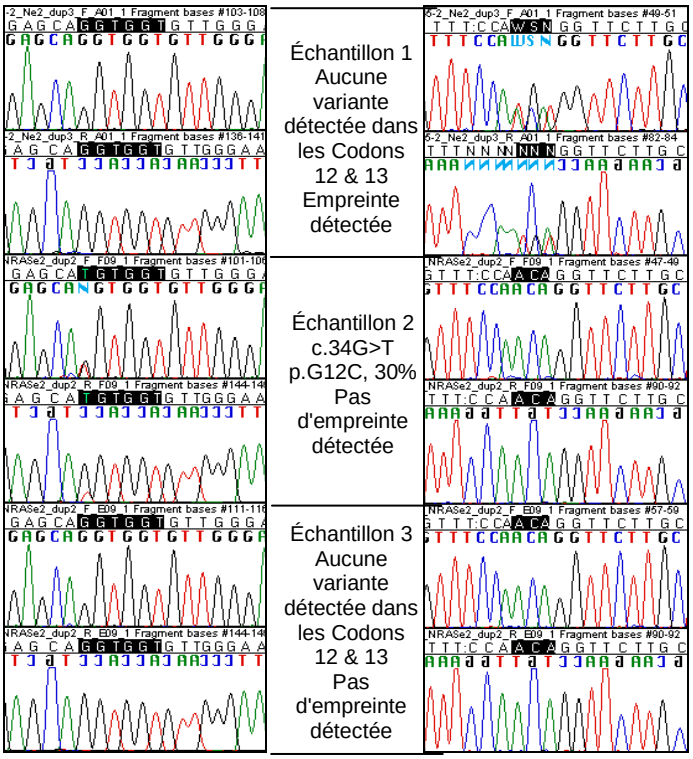
Problème 6 – Résultats SURVEYOR Nuclease échoués

LA DIGESTION SURVEYOR NUCLEASE DES POSITIVE CONTROLS A ÉCHOUÉ	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
	SURVEYOR Nuclease n'a pas été ajouté	Procédez à la digestion d'un nouvel échantillon
	La digestion SURVEYOR Nuclease a été effectuée à la mauvaise température	Procédez à la digestion d'un nouvel échantillon

Problème 7 – Pics inattendus dans le profit d'elution du produit de la digestion SURVEYOR Nuclease

LA DIGESTION SURVEYOR NUCLEASE DES POSITIVE CONTROLS A ÉCHOUÉ	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
	Mutation présente à un site inhabituel	Procéder au séquençage de l'échantillon pour vérifier la mutation

Problème 8 – Contamination des échantillons avec les contrôles Positive Control

Schémas de digestions pouvant indiquer la présence d'une région marquée d'un mélange de contrôles Positive Control et des hétéroduplexes Wild-Type	CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
 **Région des Codons 12 & 13** **Région d'empreinte du contrôle**  Échantillon 1 Aucune variante détectée dans les Codons 12 & 13 Empreinte détectée Échantillon 2 c.34G>T p.G12C, 30% Pas d'empreinte détectée Échantillon 3 Aucune variante détectée dans les Codons 12 & 13 Pas d'empreinte détectée	Mauvaise technique de pipetage	Il est important de faire très attention à éviter toute contamination croisée lors du pipetage des échantillons. Vérifiez les régions de la séquence de l'empreinte de contrôle pour détecter toute contamination éventuelle au Positive Control.

Informations relatives aux commandes

Numéro du produit	Nom du produit	Taille
710104	SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exon 2 CE IVD	100 réactions
710106	SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Exons 3 & 4 CE IVD	100 réactions
710400	SURVEYOR Scan *NRAS* Kit Exons 2, 3 & 4 CE IVD	100 réactions
710077	CRC *RAS*can Combination Kit pour *KRAS* et *NRAS* Exons 2, 3 & 4 CE IVD	230 réactions

Coordonnées

Siège de la Société
Transgenomic, Inc.
12325 Emmet Street
Omaha
Nebraska 68164
Unites States of America

N° de téléphone: (888) 233-9283*
Ou +1 (402) 452-5400
N° de fax: +1 (402) 452-5401
E-mail: support@transgenomic.com

*Pour l'Amérique du Nord uniquement

Bureau Européen
Transgenomic Limited
40 Watt Road
Hillington Park, Hillington
Glasgow G52 4RY
Unites Kingdom

N° de téléphone: +44 141 892 8800

N° de fax: +44 141 883 5967
E-mail: support@transgenomic.com

www.Transgenomic.com

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Responsabilité de traduction

Transgenomic, Inc. a fait tous les efforts possibles pour assurer l'exactitude de cette traduction. Si vous avez des questions au sujet de toute information contenue dans cette version traduite du manuel, se référer à la version anglaise ***Instructions for Use for the SURVEYOR® Scan KRAS Kit Exon 2 CE IVD for DHPLC Systems*** – 482404(EN) http://world.Transgenomic.com/files/literature/482404-EN.pdf et / ou contact Transgenomic à support@transgenomic.com.

Licences, marques & droit d'auteur

SURVEYOR Nuclease: Ce produit est fabriqué aux États-Unis sous licence exclusive d'exploitation des brevets US 6,699,980, 6,391,557, 5,869,245, des brevets étrangers leur correspondant et d'autres brevets en instance. L'utilisation de SURVEYOR Nuclease nécessite l'obtention d'une licence de la part de Transgenomic. Les établissements d'enseignement et organisations à but non lucratif disposent de droits d'utilisation limités de SURVEYOR Nuclease à des fins de recherche en achetant ce produit. La revente et tout autre utilisation sont strictement interdites. Veuillez contacter Transgenomic pour en savoir plus.

DNA Polymerase: L'utilisation de ce produit est protégée aux États-Unis par l'un ou plusieurs des brevets US suivants, et, en dehors des États-Unis, par leur demandes de brevet équivalentes: n° 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 et par les demandes en dehors des États-Unis correspondant au brevet US n° 4,889,818. L'achat de ce produit inclut une immunité limitée et non cessible contre les poursuites en vertu des demandes de brevet précédentes quant à l'utilisation de cette quantité de produit exclusive, aux fins des activités de recherche internes de l'acheteur. Aucun droit au titre d'aucune autre revendication de brevet (telles que les revendications 5' brevetées de processus de nucléase des brevets US n° 5,210,015 et 5,487,972), aucun droit de reproduire aucune méthode brevetée et aucun droit de dériver aucun service commercial d'aucune sorte, notamment et sans limitation la communication de résultats des activités de l'acheteur moyennant frais ou autre contrepartie commerciale, n'est octroyé, que ce soit de manière implicite ou explicite ou par estoppel. Ce produit est uniquement destiné à la recherche. Les utilisations diagnostiques aux termes des brevets Roche nécessitent une licence séparée émanant de Roche. Pour en savoir plus sur l'acquisition de licences, contactez le Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Californie 94404, USA. Transgenomic, SURVEYOR et WAVE sont des marques déposées.

Transgenomic, SURVEYOR et WAVE sont des marques déposées et Navigator, CRC RAScan, le logo en forme hélicoïdale, CRC *RAS*can et Advancing Personalized Medicine sont des marques de Transgenomic, Inc. Toutes les autres marques appartiennent à leurs titulaires respectifs.

© 2013 Transgenomic, Inc. Tous droits réservés. Imprimé aux États-Unis.

Document no. 482404(FR) ver-04